

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Radka Bušovská

**Interakce vybraných kosmetických aditiv
s biotransformačními enzymy**

Interaction of selected cosmetic additives with biotransformation enzymes

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Podpis

Abstrakt

Látky způsobující endokrinní dysfunkci mají negativní vliv na lidský organismus a jsou všude kolem nás. K jednomu z hlavních mechanismů jejich účinku patří vazba na buněčné receptory nebo inhibice klíčových enzymů, podílejících se na tvorbě steroidních hormonů. V této studii byly zkoumány účinky vybraných parfémů a osvěžovačů vzduchu do aut na aktivitu aromatasy jako jednoho z klíčových enzymů steroidogeneze. Aromatasa přeměňuje samčí pohlavní hormony na samičí. Inhibice tohoto enzymu vede k sníženým koncentracím estrogenů a tím může mít nepříznivé účinky na reprodukci. Vliv vybraných vůní na aktivitu aromatasy byl zkoumán na základě konverze testosteronu na estradiol. Tvorba estradiolu byla analyzována technikou TLC. Provedené orientační experimenty naznačují, že zkoumané parfémy aktivitu aromatasy výrazně neinhibují, naopak osvěžovače vzduchu do aut se jeví jako potenciální inhibitory aromatasy.

Klíčová slova:

Endokrinní dysfunkce, steroidogeneze, aromatasa, parfémy, osvěžovače vzduchu, TLC, chromatografie

Abstract

Substances which cause an endocrine dysfunction have a negative impact on the human body and can be found all around us. One of the main mechanisms of their action is the binding to cell receptors or the inhibition of key enzymes involved in steroid hormone synthesis. In this study, the inhibitory effect of selected perfumes and car air fresheners on the activity of aromatase, the key enzyme of steroidogenesis, was examined. Aromatase converts male sex hormones into the female ones. Inhibition of this enzyme results in decreased estrogen concentrations and may thus affect human fertility. The aromatase activity was examined based on the aromatization reaction of testosterone into estradiol. The formation of estradiol was monitored by TLC method. Based on the results of the pilot study the tested perfumes do not significantly inhibit the aromatase activity, while air fresheners in cars appear to be potential aromatase inhibitors.

Keywords:

Endocrine dysfunction, steroidogenesis, aromatase, perfumes, air fresheners, TLC, chromatography

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat svému školiteli, prof. RNDr. Petrovi Hodkovi, CSc., za trpělivost, čas a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování mé bakalářské práce věnoval.

Děkuji své rodině a kamarádům za poskytnuté zázemí a podporu v průběhu celého mého studia.

Obsah

1 Úvod	9
2 Teoretická část	10
2.1 Kosmetika	10
2.1.1 Složení	10
2.1.2 Parfémy	12
2.1.2.1 Historie	12
2.1.2.2 Složení	13
2.1.2.3 Nežádoucí účinky	15
2.1.3 Regulace	16
2.1.4 Testování	18
2.2 Endokrinní systém	20
2.2.1 Endokrinní dysfunkce	21
2.2.2 Steroidogeneze a cytochromy P450	21
2.2.2.1 CYP19 a pohlavní hormony	23
3 Cíle práce	26
4 Materiál a metody	27
4.1 Materiál	27
4.1.1 Použité chemikálie	27
4.1.2 Použité přístroje	30
4.2 Metody	31
4.2.1 Sledování metabolické aktivity aromatasy metodou TLC	31
5 Výsledky práce	33
5.1 Optimalizace podmínek provedení analýzy	33
5.3 Sledování vlivu parfémů na aktivitu aromatasy	38
6 Diskuze	43
7 Souhrn	45
8 Literatura	46

Seznam použitých zkratk

EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
CIR	Průzkum kosmetických přísad (<i>Cosmetic Ingredient Review</i>)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (<i>Food and Drug Administration</i>)
EVCAM	Evropské středisko pro validaci alternativních metod (<i>The European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>)
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>)
RIFM	Výzkumný ústav pro vonné materiály (<i>The Research Institute for Franrance materials</i>)
TTC	Prahová hodnota toxikologických rizik (<i>Threshold of Toxicological Concern</i>)
ICCVAM	Koordinační výbor pro validaci alternativních metod (<i>The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i>)
SCCS	Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitele (<i>Scientific Committee on Consumer Safety</i>)
IFRA	Mezinárodní asociace pro parfémy (<i>International Fragrance Association</i>)
CYP19	aromatas
3 β -HSD	3 β -hydroxysteroiddehydrogenasa
CYP17	17 α -hydroxylasa/17,20-lyasa
17 β -HSD	17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa
CYP	cytochromy P450

TLC	chromatografie na tenké vrstvě (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
TST	testosteron
ESD	estradiol
MeOH	methanol
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukována forma)
BHT	butylovaný hydroxytoluen

1 Úvod

Hormonálně aktivní látky jsou chemikálie, které mění funkci endokrinního systému. Jsou to látky schopné narušit endokrinní systém u lidí a volně žijících živočichů. Mají proto nepříznivé účinky na zdravotní stav organismu. Mohou být spojeny s poruchami učení, nedostatkem pozornosti, problémy kognitivních a mozkových funkcí a také mohou způsobit reprodukční problémy nebo potencovat vznik rakoviny. Jejich problematika se v dnešní době stále více klade do popředí, protože se nacházejí všude v životním prostředí. Jedná se o širokou škálu přírodních či člověkem vytvořených látek, které zasahují do hormonálních regulací. Patří sem například léky, pesticidy, měkčené plasty a setkáme se s nimi i v různých potravinách, pracích prostředcích či kosmetice.

K jedním z hlavních mechanismů jejich účinku patří vazba na buněčné receptory nebo inhibice klíčových enzymů, podílejících se na biosyntéze steroidních hormonů. Aromatasa je klíčový enzym, který přeměňuje samčí pohlavní hormony na samičí. Inhibice tohoto enzymu vede k sníženým koncentracím estrogenů a může tím negativně ovlivňovat schopnost reprodukce.

Velmi výhodnou metodou pro zkoumání aktivity aromatasy a orientační identifikaci hormonálně aktivních látek je sledování tvorby estradiolu pomocí chromatografie na tenké vrstvě. Na základě této rychlé metody je možno orientačně odhalit narušení normální funkce aromatasy.

2 Teoretická část

2.1 Kosmetika

Kosmetiku běžně používají lidé na celém světě již od starověku s cílem vyčistit, zlepšit či změnit vzhled pokožky, vlasů, nehtů nebo zubů. Použití kosmetiky však v některých případech souvisí s výskytem nepříznivých účinků vyplývajících z přítomnosti některých chemických látek v těchto přípravcích. Odhaduje se, že ve velkém počtu v současnosti dostupných kosmetických výrobků je přítomno až 10 000 chemických látek, včetně parabenů, ftalátů, *p*-fenylendiaminu, formaldehydu, dioxanu, triclosanu a sloučenin mnohých kovů [1]. Tyto látky mohou být spojeny s mnoha onemocněními, jako jsou rakovina, vrozené vady či vývojové a reprodukční problémy [2].

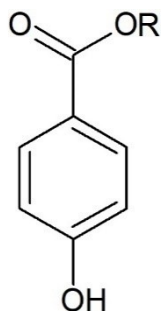
2.1.1 Složení

Kosmetické produkty obsahují různorodou heterogenní skupinu látek. Běžné kosmetické produkty obsahují kromě účinných látek též aditiva. Mezi ty patří stabilizátory, pomocné látky, které zejména upravují konzistenci, a parfémy. Z účinných látek jde zejména o mastné kyseliny v případě krémů či detergenty v případě šampónů.

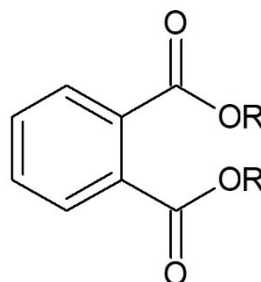
Stabilizátory chrání produkty proti oxidační degradaci, mikrobiálnímu růstu a proti UV záření. Patří sem především hydrofilní konzervanty prodlužující trvanlivost kosmetických produktů. Tuto funkci plní parabeny (Obr. 1, str. 11), deriváty kyseliny para-hydroxybenzoové, které mají antibakteriální a antimykotické účinky, nebo například disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) [3].

Mezi pomocné látky obsažené v kosmetice patří i plnidla a rozpouštědla, které upravují hustotu a omezují vypařování těkavých látek z parfémů. Kromě plnidel se používají i zahušťovadla, která zvyšují viskozitu produktu, a mohou být minerálního (křemičitan hořečnatý, oxid křemičitý) nebo lipidového charakteru (cetylalkohol). Patří zde také například polymery kyseliny akrylové [4]. Pro zklidnění pokožky a omezení ztráty vody se používají změkčovadla, mezi která patří včelí vosk, olivový olej či glycerin. Pro úpravu

konzistence produktu se používají například ftaláty (Obr. 2). Důležitou složkou krémů a „peelingů“ jsou emulgátory, které mění povrchové napětí mezi olejem a vodou za účelem zajištění homogenních směsí. Příklady používaných emulgátorů jsou polysorbáty, laureth-4 a cetylsulfát draselný [5].



Obr. 1: Obecný strukturní vzorec parabenů.



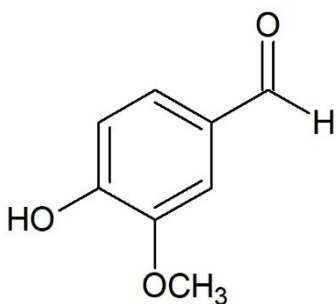
Obr. 2: Obecná chemická struktura ftalátů.
 R a $R' = C_nH_{2n+1}$; $n = 4-15$.

Velmi důležitou společnou složkou všech kosmetických výrobků jsou parfémy, které činí obdobně jako barviva výrobek pro zákazníka atraktivním. Vyskytují se ve všech produktech kosmetiky, včetně těch, které jsou označeny jako neparfémované. Zde se však vyskytují v nízkých koncentracích pouze za účelem eliminace negativních pachů. Mezi vonné látky v parfémeh, které reagují s čichovými receptory, patří zejména aldehydy, ketolátky, estery a izoprenoidy. Kromě toho, že parfémy jsou základní složkou většiny kosmetických produktů, tvoří parfémy též samostatnou kategorii kosmetiky.

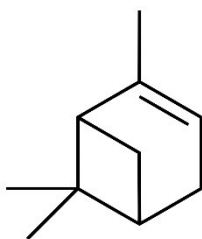
2.1.2 Parfémy

2.1.2.1 Historie

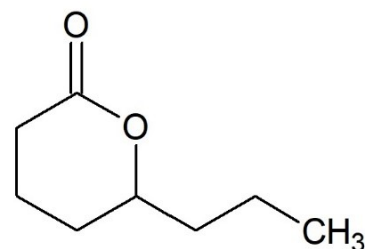
Název parfém pochází z latinského slova "per fumum", což v překladu znamená "skrze kouř" nebo "kouřem". Za první používané vůně se považují látky získávané ze dřeva při hoření [6]. Takto byly připraveny vonné látky především z volně se vyskytujících dřevin, například z borovice lesní (*Pinus sylvestris*). Jednalo se zejména o produkty degradace mastných kyselin, některé látky terpenické povahy a vonné sloučeniny vznikající degradací ligninu. Mezi tyto látky patří například vanilin (Obr. 3), alfa-pinen (Obr. 4), delta-oktalakton (Obr. 5), kyselina fenylpropanová, kyselina fenylpropanová (Obr. 6) a nona-2,4-dien (Obr. 7) [7].



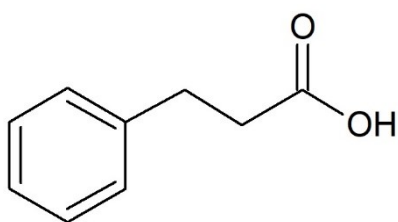
Obr. 3: vanilin



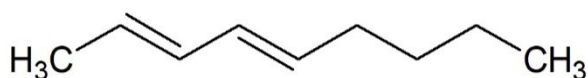
Obr. 4: alfa-pinen



Obr. 5: delta-oktalakton



Obr. 6: kyselina fenylpropanová



Obr. 7: nona-2,4-dien

Prvním používaným parfémem bylo kadidlo asi před 4000 lety [8]. V antických dobách byly parfémy často spojovány s náboženskými rituály, později byly objeveny i terapeutické účinky vonného kouře. Po důkladném zkoumání se podařilo spojit těkavé aromatické látky z vonných rostlin s olejem a tukem, čímž byly vytvořeny první aromatické masti. K této výrobě se používaly listy, květy, kořeny, větve, kůra či šťáva rostlin nejprve

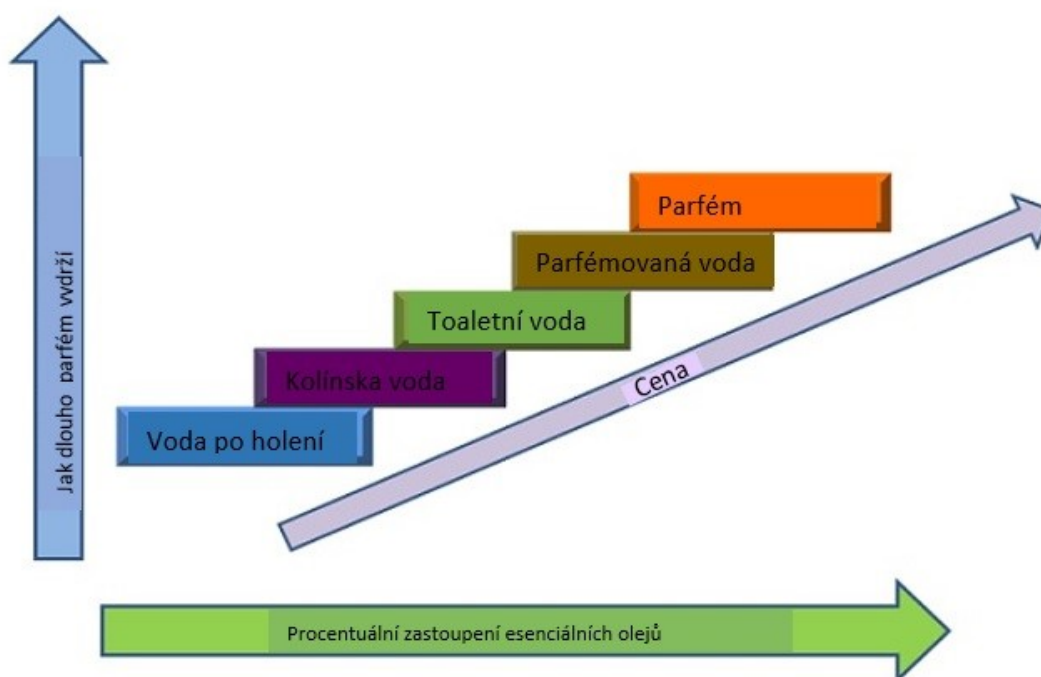
mechanicky upravené a následně převařované se živočišným tukem nebo rostlinným olejem za účelem prodloužení trvanlivosti.

Později byla rozvinutá technika destilace a výroba esenciálního oleje. První moderní evropský parfém vznikl v roce 1370 na bázi alkoholu a sloužil jako předchůdce dnešní kolínské vody. Ve středověku se aromatické parfémy začaly používat jako lék a jako dezinfekční prostředek. V polovině 18. století se místo těžkých opojných vůní začaly upřednostňovat osvěžující a lehké květinové vůně [6].

Od 20. století se začaly vyrábět „umělé“ vůně, takže drahé suroviny bylo možné nahradit synteticky připravenými vonnými látkami. Pro odvětví parfémů to znamenalo začátek experimentování s novými cenově dostupnými látkami. Od šedesátých let minulého století kvůli velkému množství parfémů na trhu o jejich úspěchu rozhoduje zejména reklama a marketing [6].

2.1.2.2 Složení

Na základě procentuálního zastoupení alkoholu se parfémy dělí na kolínskou vodu, toaletní vodu, parfémovou vodu a parfém, který je nejkoncentrovanější formou aromatických látek (Obr. 8) [6].

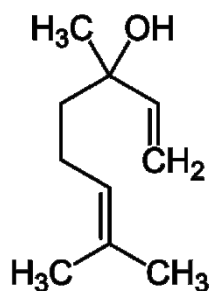


Obr. 8: Typický vztah mezi cenou parfému, jeho životností a koncentrací silic [9].

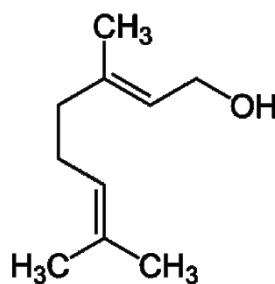
V dnešní době má parfémový průmysl k dispozici přibližně 3000 syntetických a 400 přírodních vonných látek, přičemž hotový parfém obsahuje směs 50 až 100 z nich [6]. Jsou to vonné látky, získané umělou či přírodní cestou, připomínající vůni květin, ovoce, koření, listů, plodů či kůry. Různá těkavost dala vzniknout třem základním kategoriím látek podle rychlosti výparu: hlava, tělo a základ parfému.

Některé parfémové složky jsou živočišné produkty, jako například ambra pocházející ze střev vorvaně, castoreum (bobrovina - sekret ze žláz bobra), sekret z análních žláz cibetek nebo nejsilnější a nejdražší - pižmo, které pochází z podkožního vaku samce kabara pižmového. Pižmo je považováno také za afrodisiakum, protože obsahuje látky příbuzné feromonům. Na konci 20. století se do parfémů začaly přidávat další vonné složky, jako jsou čokoláda, karamel, mandle, med či mléko [6].

Kromě těchto vonných látek se do parfémů přidávají fixativy, což jsou látky sloužící k prodloužení doby, po kterou je vůně parfému sensoricky vnímatelná. Taková délka fixace závisí především na struktuře vonných látek, zejména na funkční skupině a na její pozici v molekule sloučeniny. Často používanými terciálními alkoholy v parfumerství jsou linalool (Obr. 9), tetrahydrolinalool a dihydromyrcenol. Zatímco těmito terciálními alkoholům trvá odpaření 4 až 6 hodin, při použití primárních alkoholů, jako jsou například geraniol (Obr. 10) a citronellol, dojde k odpaření za 2 až 3 dny. Některá fixační činidla mají zároveň i příjemnou vůni (pižmo, geraniol). Pro vysokou účinnost je třeba, aby parfém obsahoval dostatečné množství a vhodné kombinace fixačních činidel [10].



Obr. 9: linalool



Obr. 10: geraniol

2.1.2.3 Nežádoucí účinky

V současné době jsou známy případy, kdy některé vonné látky mohou způsobit astmatické reakce, zejména u pacientů s těžkým nebo atopickým astmatem [11]. Stejně i furanokumarin přítomný v přírodních extraktech grapefruitu nebo celeru může způsobit kožní alergické reakce a zvýšit citlivost na UV záření [12]. Nežádoucí účinky na kůži zahrnují okamžité kontaktní reakce, alergickou kontaktní dermatitidu a fotosenzitivitu. Vůně jsou z kosmetiky nejčastější příčinou alergické kontaktní dermatitidy, přibližně 1 % populace trpí alergií na některou z aromatických látek [13]. Jako modelové látky pro zjištění kožní alergie se používají definované směsi vůní, balzám z Peru, kalafuna a propolis [14].

Existují důkazy o tom, že syntetické náhražky pižma na bázi nitroaromátů (mošus - xylen) mohou zvyšovat riziko vzniku rakoviny u testovaných zvířat [15]. Zároveň však bylo zjištěno, že pro účely parfumérství je jejich omezené používání bezpečné [16]. Mnohé přírodní aromatické látky (bazalkový či růžový olej) obsahují alergeny nebo karcinogenní sloučeniny, jejichž bezpečnost je regulována nařízeními (např. nařízení EU o kosmetických přípravcích stanovuje povolené koncentrace methyleugenolu [17]) nebo prostřednictvím omezení stanovených Mezinárodní asociací pro parfémy.

Dalším rizikovým faktorem je nesnášenlivost parfému při inhalační expozici, což se může projevovat bolestmi hlavy, kašlem, pocity nevolnosti a respiračními onemocněními [18]. Řada látek přítomných v parfémeh může být toxická pro drobné živočichy, například tricyklodecenyllallylether je častou součástí parfémů a zároveň má repelentní účinky [19].

2.1.3 Regulace

Snahou Spojených států amerických a Evropské unie je zajistit bezpečnost kosmetických výrobků pro spotřebitele prostřednictvím vědecky podložené regulace. V USA je kosmetický průmysl regulován americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (*U.S. Food and Drug Administration, FDA*), který má širokou regulační pravomoc v rámci zákona o potravinách, lécích a kosmetických přípravcích. V rámci Evropské komise je Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 důležitou evropskou legislativou, stanovující pravidla, která musí splňovat každý kosmetický výrobek dodávaný na trh, aby se tak zajistilo fungování vnitřního trhu a vysoká úroveň ochrany zdraví lidí [17]. Každá země v EU má příslušný orgán odpovědný za dodržování tohoto souladu.

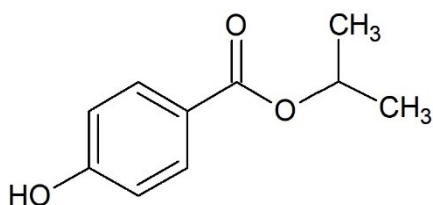
Důkaz o bezpečnosti kosmetického přípravku a každé jeho složky je odpovědností výrobce nebo jeho distributora jak v USA tak v EU, přičemž v EU musí být navíc vypracována zpráva o bezpečnosti kosmetického přípravku v souladu s požadavky, které určuje legislativa a platné normy [17]. Pro kosmetické výrobky není potřeba žádné povolení před uvedením na trh s výjimkou barevných přísad a v EU navíc s výjimkou účinných látek na ochranu před slunečním zářením a konzervačních látek. Průmyslově financovaná skupina vědeckých a lékařských expertů posuzuje bezpečnost kosmetických složek a poskytuje informace o bezpečnosti používaných látek v rámci Průzkumu kosmetických přísad (*Cosmetic Ingredient Review, CIR*) [20].

Nezávislé vědecké výbory poskytují kvalifikována vědecká doporučení o kosmetických přípravcích. V EU je to Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitele (*Scientific Committee on Consumer Safety, SCCS*), který je zodpovědný za prozkoumání všech složek kosmetiky, které jim EU pošle k posouzení. Bezpečnostní posudky SCCS jsou veřejně dostupné na internetových stránkách [21]. Nezávislým vědeckým výborem, který posuzuje kosmetické přípravky v USA je CIR, jehož bezpečnostní stanoviska jsou publikována ve vědecké literatuře a jsou veřejně dostupná [22].

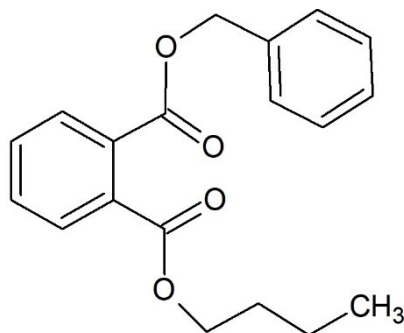
Předpisy FDA uvádějí složky, které se v kosmetických přípravcích nesmějí používat [23]. Mezinárodní asociace pro parfémy (*International Fragrance Association, IFRA*) stanovilo 174 vonných látek, které byly zakázány nebo omezeny ve výrobcích. EU zakázala

1 378 látek, z toho 80 % však nikdy nebylo použitých v kosmetických prostředcích [24]. Isopropylparaben (Obr. 11) je, jako i všechny parabeny, kromě methylparabenu a ethylparabenu, zakázán, protože inhibují aromatasu [25]. Zakázán je i butylbenzylftalát, který je jednou z nejčastěji používaných látek v chemickém průmyslu a je považován za karcinogen, který narušuje lidský hormonální systém a reprodukci (Obr. 12).

V USA i v EU musí být všechny složky kosmetického přípravku na něm uvedené. Pokud jde o vůni nebo chuť, mohou být složky na etiketě uvedeny jako "vůně" nebo "aroma" s výjimkou 26 specifických složek parfémů v EU [17], které musí být zahrnuty do seznamu složek. Opalovací krémy jsou v USA regulovány jako volně prodejné léky a v EU jsou považovány za kosmetiku, přičemž UV filtry vyžadují před uvedením na trh schválení [17].



Obr. 11: Isopropylparaben



Obr. 12: butyl benzyl ftalát

2.1.4 Testování

Výrobci používají pro testování výrobků údaje o bezpečnosti, které jsou již k dispozici o jednotlivých složkách a o výrobcích s podobným složením. Bezpečnostní údaje od dodavatelů kosmetických přísad jsou často publikovány ve vědeckých databázích (například PubMed a TOXNET).

Pro stanovení bezpečnosti nových výrobků využívají Spojené státy americké i testování na zvířatech. Ve všech případech, kdy se používá testování na zvířatech, si FDA prosazuje, aby výzkum a testování poskytovaly maximální množství užitečných informací při použití minimálního počtu experimentálních zvířat a snaží se zajistit nejhumánnější možné metody testování [26]. Na rozdíl od situace v USA je komerční testování kosmetiky na zvířatech v Evropské unii zakázáno. Zákaz testování hotových kosmetických výrobků na zvířatech je platný již od 11. září 2004. Zákaz testování kosmetických přísad nebo kombinace přísad na zvířatech a zákaz uvádění na trh hotových kosmetických výrobků a přísad EU, které byly testovány na zvířatech, je platný od 11. března 2009 [17].

Pro vyvíjení a hodnocení nových alternativ k testům na zvířatech má Evropská unie k dispozici Evropské středisko pro validaci alternativních metod (*The European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM). Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (*Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD) je nadnárodní organizace se sídlem v Paříži pro koordinaci ekonomické a sociálně-politické spolupráce členských států EU [27]. Seznam validovaných alternativních metod je možné nalézt na stránkách ECVAM a AltTox [28]. Alternativními metodami jsou převáděny testy například na primárních buňkách, buněčných liniích, embryích, izolovaných enzymech či proteinech.

Na myší embryonální fibroblastové buněčné linie se alternativními metodami testuje akutní toxicita, která umožňuje posouzení obecných toxických účinků jednorázové dávky nebo vícenásobných dávek chemické látky nebo produktu [29]. Touto alternativní *in vitro* metodou nelze zkoumat chronickou toxicitu, která by se dala zkoumat pouze *in vivo* testy např. na hlodavcích. Zde se zpravidla zkoumá orální [30] a dermální toxicita [31]. Právě absence testování chronické toxicity je problémem kosmetických výrobků, jelikož řada negativních účinků se může projevit až následkem dlouhodobého užívání daného výrobku.

Použitím buněčných linií a embryonálních buněk *in vitro* je možné posuzovat karcinogenní potenciál chemikálií [32]. Na embryonálních fibroblastech je zkoumána též fototoxicita [33]. Některé studie však ukázaly, že fototoxický efekt pozorovaný na embryonálních buňkách nemusí nutně korelovat s výsledky u dobrovolníků.

Platnou náhradou *in vivo* testů jsou komerčně dostupné modely rekonstruované lidské pokožky EpiSkin™, EpiDerm™ a SkinEthic™, které vykazují podobnost s přirozenou lidskou pokožkou z hlediska morfologie a složení lipidů [34]. Tyto modely jsou často využívány k určení potenciálu degradace kožní tkáně [35].

Lidské kmenové buňky z tukové tkáně byly použity pro testování inhibice adipogeneze jako adekvátní citlivý *in vitro* model. Tento alternativní test umožní snížit počet zvířat pro testování v prvních krocích predikce toxicity látek [36].

Výše uvedené alternativní metody spolu s testováním na zvířatech byly využívány i pro zkoumání vonných látek v parfémtech. Klinické studie testují běžně používané složky parfému jako linalol nebo limonen mikronukleárním testem na periferních lidských lymfocytech *in vitro* [37].

Výzkumný ústav pro vonné materiály (*The Research Institute for Fragrance materials*, RIFM) udržuje databázi fyzikálně-chemických, toxikologických a ekotoxikologických údajů o bezpečnosti vonných látek. Pro posuzování složek vůní využívá RIFM výpočetní toxikologii, metodiky *in vitro*, nové metody pro určení celkové expozice, vliv vonných látek na životní prostředí a stanovuje prahovou hodnotu toxikologických rizik (*Threshold of Toxicological Concern*, TTC). Alternativní testy následně vyhodnotí Koordinační výbor pro validaci alternativních metod (*The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM) s cílem zajistit, aby alternativní test přesně určil, zda je výrobek nebezpečný.

2.2 Endokrinní systém

Endokrinní systém (také označovaný jako hormonální systém) patří spolu s imunitním a nervovým systémem ke třem velmi důležitým kontrolním systémům u savců. Pro zajištění homeostáze je třeba dokonalé řízení organismu, což zajišťuje soustava žláz s vnitřní sekrecí spolu s nervovou soustavou, které reagují na podněty jak vnějšího, tak vnitřního prostředí.

Endokrinní systém zahrnuje všechny žlázy v těle, jejichž produkty jsou hormony. Pro ně je charakteristické, že mají specifický účinek, působí cíleně na konkrétní tkáň a mají velmi vysokou účinnost, takže stačí malá koncentrace látky pro vyvolání potřebné reakce. Endokrinní žlázy vylučují do organismu tři druhy hormonů: deriváty aminokyselin, polypeptidy a steroidní hormony. U člověka je známo více než 50 funkčních hormonů [38].

Endokrinní systém se vedle savců vyskytuje i u dalších obratlovců (ryby, obojživelníci, plazi a ptáci) a též u bezobratlých živočichů (měkkýši, členovci, hmyz). Základní funkce endokrinního systému je regulace základních fyziologických funkcí, mezi které patří řízení koncentrace glukosy v krvi, regulace metabolismu, vývoj centrální nervové soustavy, růst či funkce a rozvoj reprodukční soustavy pomocí androgenů a estrogenů [39]. V tkáních a žlázách se nacházejí specializované typy buněk, jejichž úkolem je syntetizovat, skladovat a uvolňovat hormony přímo do krve. Hormony mohou působit přímo v místě vzniku a ovlivňovat tak mateřskou tkáň (autokrinní sekrece) a okolní tkáň (parakrinní sekrece) nebo jsou dopraveny systémově pomocí mízy, či krevním řečištěm na jiné místo, kde působí svým účinkem (endokrinní sekrece). Normální fungování endokrinního systému přispívá k udržení homeostáze a schopnosti organismu kontrolovat a regulovat reprodukci, vývoj a chování jedince.

Steroidní hormony jsou lipofilní povahy, takže pronikají do buňky samovolně přes buněčnou membránu a díky vysoce specifické vazbě s jadernými receptory působí přímo na DNA, což vede k ovlivnění transkripce a následně syntézy proteinů v buňce [39]. Tyto procesy mohou být narušovány tzv. endokrinními „disruptory“.

2.2.1 Endokrinní dysfunkce

Různé chemikálie, které se nacházejí i v přírodě, mají potenciál narušit endokrinní systém u lidí a volně žijících živočichů. Endokrinní „disruptor“ je exogenní látka nebo směs, která mění funkci endokrinního systému, čímž negativně ovlivňuje zdraví organismu nebo dokonce i jeho potomstva. Tyto látky mohou způsobit reprodukční problémy, zvýšit riziko vzniku rakoviny a mohou mít různé nepříznivé vlivy na růst a vývoj [40].

Důležitými cíli chemikálií narušujících endokrinní systém jsou často klíčové enzymy, které se podílejí na syntéze a metabolismu steroidních hormonů. Některé chemikálie mohou narušit hormonální rovnováhu právě interferencí s funkcí klíčových enzymů zapojených do biotransformace steroidů. Mnohé chemikálie jsou také agonisty nebo antagonisty estrogenních receptorů, i když mají nižší afinitu vzhledem k endogenním hormonům jako 17 β -estradiol a estron [41].

2.2.2 Steroidogeneze a cytochromy P450

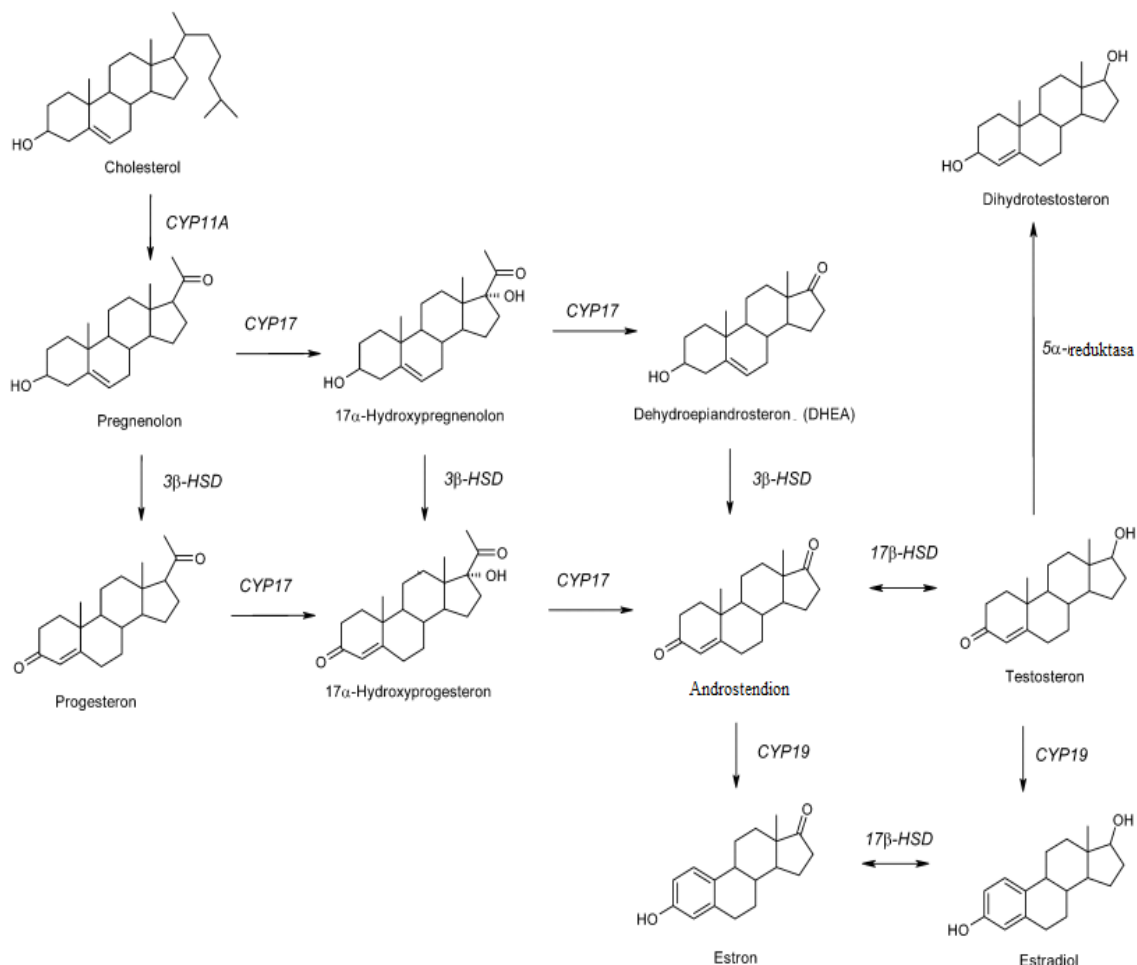
Cytochromy P450 (CYP) patří mezi nejdůležitější enzymy, které biotransformují xenobiotika (cizorodé látky) a tím se podílejí na ochraně buněk. Substráty CYP jsou přeměňovány na polárnější produkty, díky čemuž mohou být z organismu snadněji vyloučeny. Kromě toho, že vlivem CYP dochází k detoxikaci cizorodých látek, může v některých případech CYP aktivovat xenobiotika. Aktivace xenobiotik může být pozitivní, pokud se jedná o léčiva, které se tak mění na jejich aktivní formy. Produkt aktivace však může být ještě toxičtější než původní látka a v krajních případech i kancerogenní [40].

Cytochromy P450 jsou klíčovými enzymy i pro metabolismus endogenních látek, například lipidů či žlučových kyselin. Celá řada cytochromů P450 se podílí též na steroidogenezi (Obr. 13, str. 23).

Steroidogeneze je soubor procesů, kterými se z cholesterolu vytvářejí biologicky aktivní steroidní hormony (Obr. 13, str. 23). Jsou syntetizovány ve specifických buňkách především v nadledvinách, vaječnících, varlatech, placentě a mozku a mají důležitý význam

v zachování reprodukčních schopností jedince, stejně tak jako v udržení homeostáze organismu. Syntéza všech steroidních hormonů *de novo* začíná přeměnou cholesterolu na pregnenolon (odštěpení postranního řetězce cholesterolu) prostřednictvím enzymu CYP11A. CYP11A se nachází v mitochondriích všech tkání syntetizujících steroidní hormony. Pregnenolon se konvertuje na progesteron pomocí 3 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (3 β -HSD). Pregnenolon a progesteron tvoří prekuzory pro všechny ostatní steroidní hormony. Všechny steroidogenní procesy probíhají v kůře nadledvin [40]. Enzym 17 α -hydroxylasa/17,20-lyasa (CYP17) se nachází ve vaječnících a varlatech a je zodpovědný za 17 α -hydroxylaci a odštěpení postranního řetězce steroidních struktur C17-20, která se uskutečňuje v endoplazmatickém retikulu. V kůře nadledvin je CYP17 zodpovědný za hydroxylaci pregnenolonu a progesteronu za vzniku 17 α -hydroxysteroidů. Dva 17 α -hydroxylované steroidy mohou být pomocí CYP17 přeměněny na slabé androgeny, dehydroepiandrosteron a androstendion.

17 α -Hydroxysteroidy se dále konvertují na androstendion a testosteron ve vaječnících a varlatech. Rovnováha mezi těmito androgeny závisí na aktivitě 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (17 β -HSD). CYP19 (aromatasa) dále přeměňuje androstendion na estron a testosteron na estradiol [41].



Obr. 13: Biosyntéza androgenů a estrogenů z cholesterolu de novo. Převzato a upraveno [41].

2.2.2.1 CYP19 a pohlavní hormony

Mezi steroidy řadíme i látky vyznačující se hormonální aktivitou. Steroidní hormony můžeme nalézt u savců, plazů, ryb či obojživelníků. Steroidy dělíme podle několika kritérií [42]:

Podle struktury:

- odvozené od pregnanu: hormony kůry nadledvinek (kortikoidy) a progesteron
- odvozené od androstanu: mužské pohlavní hormony (testosteron a androsteron)
- odvozené od estranu: ženské pohlavní hormony (estrogeny)

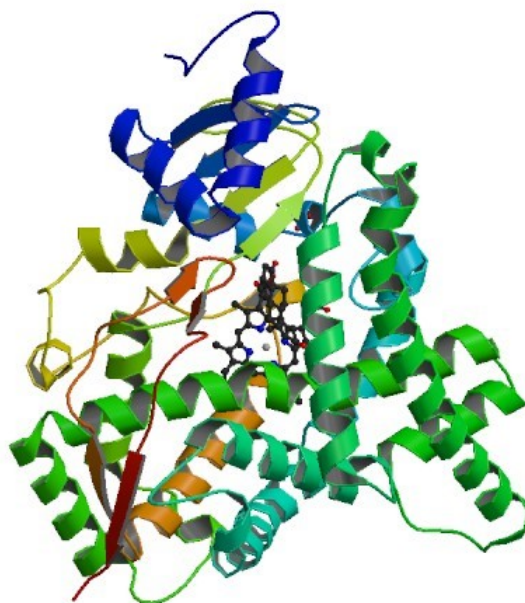
Podle účinku:

- pohlavní hormony
- hormony kůry nadledvinek

Nejdůležitějším hormonem ze skupiny androgenů, samčích pohlavních hormonů, je testosteron. Tvoří se v intersticiálních buňkách varlat a v menší míře v kůře nadledvinek. Jeho produkce je podmínkou normálního průběhu spermatogeneze. U muže odpovídá rovněž za vývoj sekundárních pohlavních znaků. Jeho hlavním metabolickým účinkem je aktivace anabolických procesů, zejména podpora syntézy kosterních bílkovin. V současnosti existuje řada syntetických derivátů testosteronu s anabolickým účinkem, které bývají ve sportovním odvětví často zneužívány [42].

Ze skupiny estrogenů, samičích pohlavních hormonů, je nejdůležitějším hormonem estradiol. Jeho produkce je podmínkou správné tvorby pohlavních znaků u žen, odpovídá za proliferaci endometria, uskladňování tuku v podkoží a zastavení růstu dlouhých kostí. Vzniká z testosteronu aromatizací kruhu A. Na sedmnáctém uhlíku je v poloze beta navázána hydroxylová skupina. Estradiol je biologicky aktivní jen v této formě. V případě, že se hydroxylová skupina vyskytuje v poloze alfa, jde o biologicky inaktivní estradiol. Estron vzniká z estradiolu zejména u žen po menopauze [42].

Cytochromem P450, který se podílí na biosyntéze estrogenů je aromatasa (CYP19) (Obr. 14, str. 25) [44]. Vytvořením aromatického kruhu ve steroidní molekule CYP19 transformuje androgeny na estrogény. Aromatasa je přítomna nejen v buňkách zapojených do syntézy estrogenů *de novo* (buňky lidské kůry nadledvin, ovariální buňky), ale také v tkáních, které využívají androstendion či testosteron z krve jako prekurzory (mozek, tuk a placenta). Díky své funkci aromatasa hraje velmi důležitou roli v sexuální odlišnosti, vývoji, reprodukci a chování. Látky interferující s katalytickou aktivitou aromatasy budou narušovat endokrinní regulační procesy, jako je estrální cyklus, rozvoj puberty, odlišnosti pohlaví a chování. Inhibice enzymů tvořících steroidní hormony může nastat v případě substrátové kompetice nebo různými formami nekompetitivní inhibice [41].



Obr. 14: Struktura lidského rekombinantního CYP19 (aromatasy). Uprostřed je tmavomodrou barvou vyznačený hem [43].

3 Cíle práce

Cílem předkládané bakalářské práce bylo studovat účinky vybraných vůní (parfémů a osvěžovačů vzduchu do aut) na aktivitu aromatasy. K dosažení tohoto cíle bylo třeba splnit následující dílčí úkoly:

- Optimalizace reakční směsi a TLC separace hormonů
- Testování vlivu vybraných vůní na aktivitu aromatasy

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Použité chemikálie

Sigma-Aldrich (Německo)

silikagelové TLC dosky (silikagel na TLC hliníkové fólii, 5x10 cm), letrozol, NADPH

Lach-Ner (Česká republika)

dichlormethan, hexan, dihydrogenfosforečnan draselný

Lachema (Česká republika)

diethylether

VWR Chemicals (Francie)

methanol

Koch Light Laboratories (Anglie)

testosteron, estradiol

Corning® Supersomes™

lidský CYP19 + NADPH:CYP oxidoreduktasa

Vzorky parfémů

Miss Dior™ Blooming Bouquet (alkohol, voda, parfém (vůně), ethylhexylmethoxycinamát, limonen, butylfenylmethylpropional, butylmethoxydibenzoylmetan, ethylhexylsalicylát, hexylcinnamal, linalool, benzylsalicylát, alfa-isomethylionon, BHT, citronellol, isoeugenol, citral, geraniol, benzylalkohol, tokoferol, CI 14700 (červená 4), CI 60730 (fialová 2), CI 19140 (žlutá 5))

Dior™ J'Adore (alkohol, parfém (vůně), voda, butylfenylmethylpropional, benzylsalicylát, hexylcinnamal, hydroxycitronellal, citronellol, ethylhexylmethoxycinamát, alfa-isomethylionon, limonen, linalool, butylmethoxydibenzoylmetan, ethylhexylsalicylát, geraniol, BHT, benzylbenzoát, citral, cinnamylalkohol, benzylcinamát, benzylalkohol, farnesol, tokoferol, CI 14700 (červená 4), CI 19140 (žlutá 5), CI 60730 (fialová 2))

Bulgari™ Goldea The Roman Night (denaturovaný alkohol (SD alcohol 39-C), parfém (vůně), voda, linalool, benzylsalicylát, benzylalkohol, limonen, hydroxycitronellal, ethylhexylmethoxycinamát, geraniol, citronellol, hexylcinnamal, cinnamylalkohol, kumarin, butylmethoxydibenzoylmetan, ethylhexylsalicylát, benzylbenzoát, citral, isoeugenol, eugenol, farnesol, BHT)

Chloé™ Love Story (denaturovaný alkohol, parfém (vůně), ethylhexylmethoxycinamát, butylfenylmethylpropional, benzylsalicylát, benzofenon-3, ethylhexylsalicylát, hydroxycitronellal, limonen, linalool, alfa-isomethylionon, butylmethoxydibenzoylmetan, citronellol, hexylcinnamal, geraniol, BHT, benzylbenzoát, citral, kumarin, benzylalkohol, propylenglykol, akryláty/kopolymer octylakrylamidu, hydrolyzované estery jojoby, CI 15985 (žlutá 6), CI 19140 (žlutá 5), CI 60730 (fialová 2), CI 14700 (červená 4))

Hugo Boss™ Bottled (denaturovaný alkohol, voda, parfém (vůně), PEG-6 glyceridy kyseliny kaprylové / kaprinové, PEG-40 hydrogenovaný ricinový olej, ethylhexylmethoxycinamát, diethylaminohydroxybenzoyl, hexylbenzoát, allantoin, kyselina mléčná, hydroxid sodný, BHT, linalool, limonen, geraniol, citral, citronellol, eugenol, cinnamal, benzylbenzoát)

Lancôme™ La Vie Est Belle (alkohol, parfém (vůně), voda, linalool, benzylsalicylát, limonen, methylantranilát, tris(tetramethylhydroxypiperidinol), citrát, ethylhexylmethoxycinamát,

butyl metoxydibenzoylmetan, BHT, CI 14700 (červená 4), CI 17200 (červená 33), geraniol, alfa-isomethylionon, kumarin, farnesol, citral, citronellol, benzylalkohol, benzylbenzoát)

Versace™ Bright Crystal (denaturovaný alkohol (SD alcohol 39-C), parfém (vůně), voda, butylfenylmethylpropional, ethylhexylmethoxycinamát, linalool, citronellol, ethylhexylsalicylát, butylmethoxydibenzoylmetan, limonen, CI 17200 (červená 33), CI 15985 (žlutá 6))

Chanel™ N°5 (alkohol, voda, parfém (vůně), benzylalkohol, benzylbenzoát, benzylcinamát, benzylsalicylát, cinnamylalkohol, citral, citronellol, kumarin, eugenol, farnesol, geraniol, hydroxycitronellal, isoeugenol, limonen, linalool, alfa-isomethylionon, butylmethoxydibenzoylmetan, CI 19140 (žlutá 5), CI 15985 (žlutá 6), CI 17200 (červená 33), CI 14700 (červená 4))

Vzorky osvěžovačů vzduchu do aut:

Parfém 1 (2-benzylidenheptanal, 3,7-dimethylokta-1,6-dien-3-ol, 2-fenyletanol, citronellol, benzylsalicylát, terpineolacetát, 3,7-dimethylokta-2,6-dien-1-ol, 2-(4-terc-butylbenzyl) propanal, dipenten, 3,7-dimethyl-1,6-oktadien-3-ylacetát, benzylacetát, 2,6- dimethylokt- 7-en-2-ol, terpineol, borovicový olej, 2,6- oktadien- 1- ol- 3,7- dimethylacetát, indol, 2- methylundekanal, 3,7- dimethylokta- 2,6- dienal, 2,4-dimethylcyklohex-3-en-1-karbaldehyd, ionon, aldehyd alfa-hexylcinamové kyseliny)

Parfém 2 (4-terc-butylcyklohexylacetát, terpineol acetát, citronellol, 2,6- dimethylokt- 7- en- 2-ol, terpineol, 2-fenyletanol, aldehyd alfa-hexylcinamové kyseliny, benzylacetát, difenylether, 2-(4-terc-butylbenzyl) propionaldehyd, dodekanal, 3- methyl-4-(2,6,6-trimethyl-2-cyklohexen-1-yl) -3-buten-2-on, 2-methylundekanal, benzylsalicylát, undek-10-enal, kumarin, allyl 3-cyklohexylpropionát, dodekanitril, 2,4- dimethylcyklohex-3-en-1-karbaldehyd, 2,6-di-terc-butyl-*p*-kresol, 1- (2,6,6- trimethyl- 3- cyklohexen-1-yl)-2-buten-1-on, pin-2(3)-en)

Parfém 3 (D-limonen, anýzalkohol, kumarin, allylhexanoát, dimethylbenzylkarbinylnacetát, isoamylbutyrát, benzylbenzoát, 3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyd)

4.1.2 Použité přístroje

Centrifuga

Schoeller Instruments, Hettich Zentrifugen™ EBA 270 s výkyvným rotorem 6 x 15 ml
(Německo)

Vortex

IKA™ MS1 Minishaker (USA)

Inkubátor

Julabo TW12 (Německo)

Vakuová pumpa

Laboport, KNF Lab (USA)

4.2 Metody

4.2.1 Sledování metabolické aktivity aromatasy metodou TLC

Inkubační směs o celkovém objemu 500 μ l obsahovala:

- 50 μ M testosteron (TST) v (5mM zásobní roztok v methanolu)
- 15-60 nM rekombinantní CYP19
- 4 μ l/ml parfém (10x ředěný zásobní roztok v methanolu – aplikováno 20 μ l) nebo 1,6-4 μ l/ml vůně do auta (10-25x ředěný zásobní roztok v methanolu – aplikováno 20 μ l)
- 50-250 μ M letrozol (0,833-4,167 mM zásobní roztok v methanolu)
- 1 mM NADPH (50 μ M zásobní roztok v destilované vodě) nebo 1 mM NADPH-generující systém
- K-fosfátový pufr (0,1 M, pH 7,4) do finálního objemu 500 μ l

Složení 10 mM NADPH-generujícího systému:

0,1 mM NADP⁺

1 mM MgCl₂

1 mM glukosa-6-fosfát

0,1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

Do skleněné zkumavky byl odměřený pufr, zásobní roztok TST jako substrátu a CYP19. Tato reakční směs byla rozdělena do dalších skleněných zkumavek po 500 μ l. Do těchto zkumavek byl přidán parfém, osvěžovač vzduchu do auta, letrozol nebo pouze MeOH. Zkumavky byly v inkubátoru temperovány na 37 °C po dobu 3 minuty a následně byl přidán roztok NADPH, NADPH-generující systém nebo jen destilovaná voda. Okamžitě po jejich přidavku byla zahájena inkubace (0, 10, 20 nebo 40 minut) při teplotě 37 °C za stálého třepání v inkubátoru při otáčkách 50 RPM.

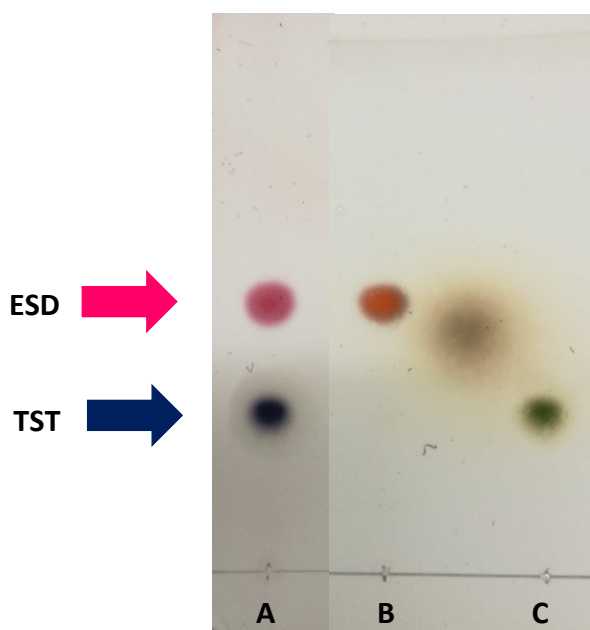
Po uplynutí inkubační doby byla reakce ukončena přidavkem 2 ml CH_2Cl_2 , směs ve zkumavkách byla promíchána po dobu 10 sekund na přístroji Vortex a následně byla odstředěna na centrifuze Hettrich při rychlosti 3000 RPM po dobu 5 minut. Ze spodní organické fáze bylo odebráno automatickou pipetou 1,5 ml do čistých skleněných zkumavek. Směsi byly při zahřívání na vodní lázni o teplotě 40 °C odpařené proudem vzduchu.

Odparek byl smyt se stěn 200 μl CH_2Cl_2 a bylo provedeno finální odpaření. Následně byl obsah zkumavky rozpuštěn ve 20 μl MeOH a nanesen přibližně 1,5 cm od spodního okraje na silikagelovou desku pro TLC. Vyvíjení desky probíhalo v chromatografické vaně rozpouštědlovou soustavou hexan:diethylether v poměru 1:4 (v/v). K vizualizaci skvrn byl použit 10%-ní (v/v) vodný roztok kyseliny sírové, nanesený pomocí rozprašovače. Po vysušení na vzduchu byla deska zahřívána proudem horkého vzduchu o teplotě cca 120 °C za pomoci fénu. Nakonec byla deska ještě opatrně a krátce zahřívána na plotýnce (300°C).

5 Výsledky práce

5.1 Optimalizace podmínek provedení analýzy

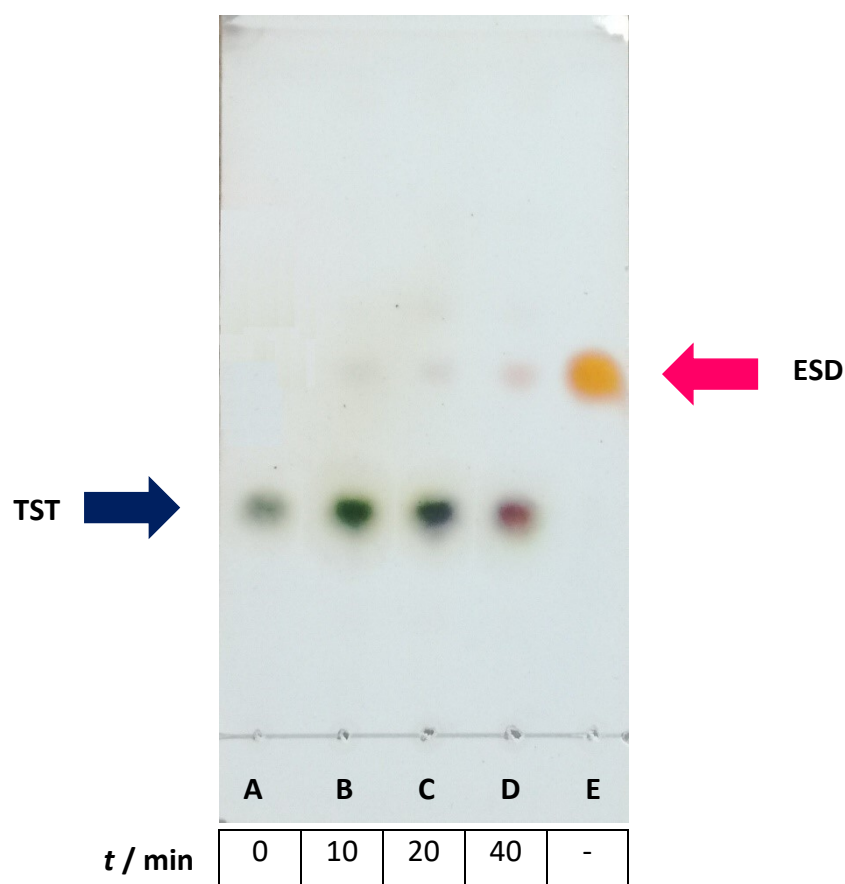
Ještě předtím, než se začaly provádět experimenty s vybranými vůněmi, byla nutná optimalizace podmínek provedení TLC analýzy. V první řadě bylo zkoumáno, zda je složení mobilní fáze, konkrétně hexan:diethylether v poměru 1:4 (v/v), vhodné pro separaci testosteronu (TST) a estradiolu (ESD) (Obr. 15).



Obr. 15: TLC standardů. A: směs testosteronu (TST) a estradiolu (ESD) vytřepaná z pufry; B: standard ESD; C: standard TST

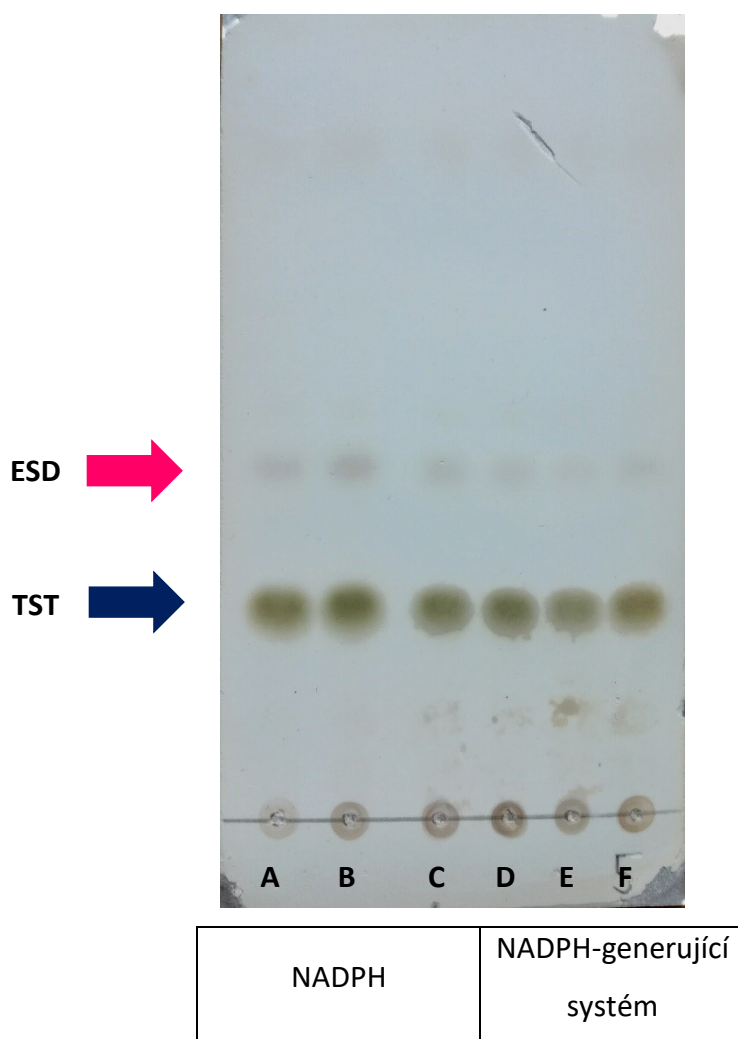
Namísto reakční směsi byl zde připraven pouze směsný standard TST a ESD v pufru, který byl vytřepán 2 ml CH_2Cl_2 . Po vizualizaci bylo prokázáno, že došlo k dostatečné separaci obou hormonů (Obr. 15, dráha A). Následně bylo nanášených 10 μl zásobního roztoku ESD na dráhu B a 10 μl zásobního roztoku TST na dráhu C, aby bylo možné přiřazení zón příslušným hormonům.

Pro zajištění dostatečné tvorby produktu (ESD) aromatizační reakcí byla provedena optimalizace inkubační doby (Obr. 16). Byly testovány časy 10, 20 a 40 minut. TLC deska na Obr. 16 tedy ukazuje závislost tvorby produktu na čase. Pro srovnání produktu se standardem bylo na poslední dráhu nanesených 10 μ l 50 μ M zásobního roztoku ESD (Obr. 16, dráha E).



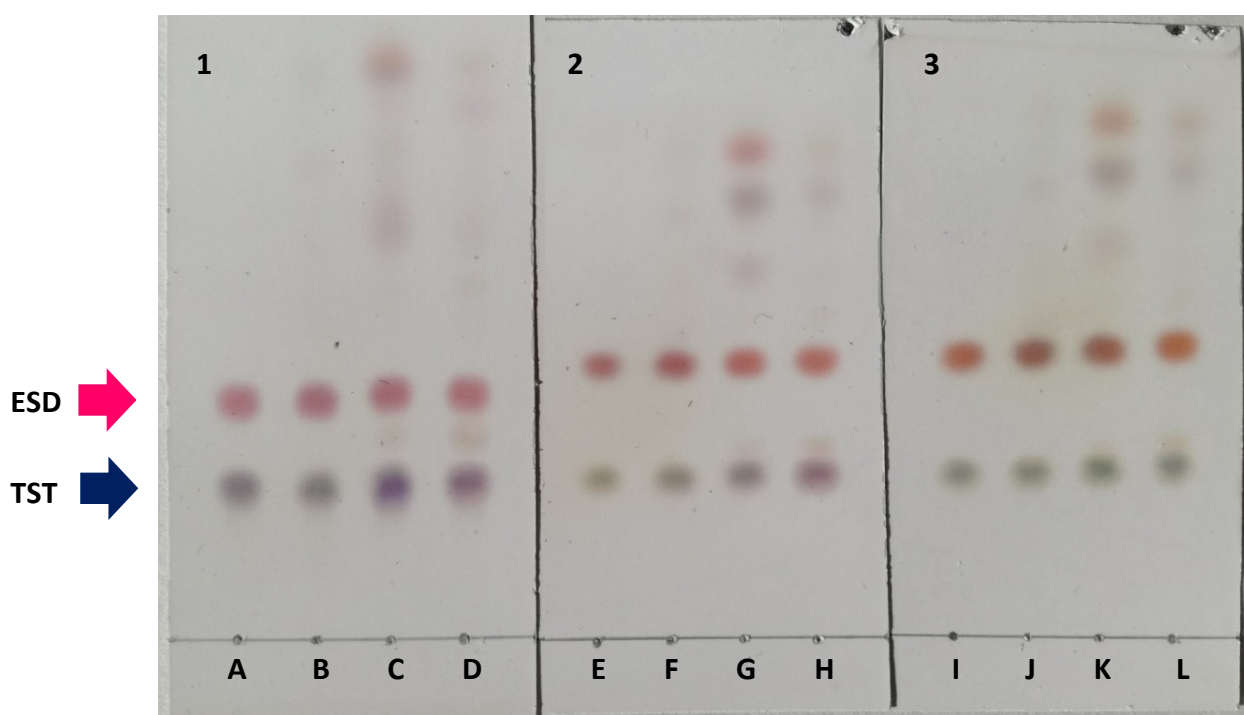
Obr. 16: optimalizace délky inkubace reakční směsi. Reakční směs obsahovala pufr, TST a CYP19 a byla inkubována: A: 0 min, B: 10 min, C: 20 min, D: 40 min. Na dráhu E bylo nanesených 10 μ l 50 μ M zásobního roztoku ESD. Koncentrace aromatasy v reakční směsi je 30 nM.

Dále byla ověřována dostatečnost množství kofaktoru NADPH pro čas inkubace 40 minut. Byla srovnávána tvorba ESD v přítomnosti NADPH-generujícího systému a kofaktoru NADPH. Prováděním testů v triplicátech byla taktéž zkoumána i reprodukovatelnost experimentu. Reakční směs v prvních třech drahách (A, B, C) na Obr. 17 obsahovala NADPH a v posledních třech drahách (D, E, F) NADPH-generující systém.



Obr. 17: Porovnání NADPH a NADPH-generujícího systému. Reakční směs obsahovala pufr, TST a CYP19. Dráhy A, B, C: NADPH a dráhy D, E, F: NADPH-generující systém. Koncentrace aromatasy v reakční směsi je 30 nM. Inkubace reakčních směsí trvala 40 minut.

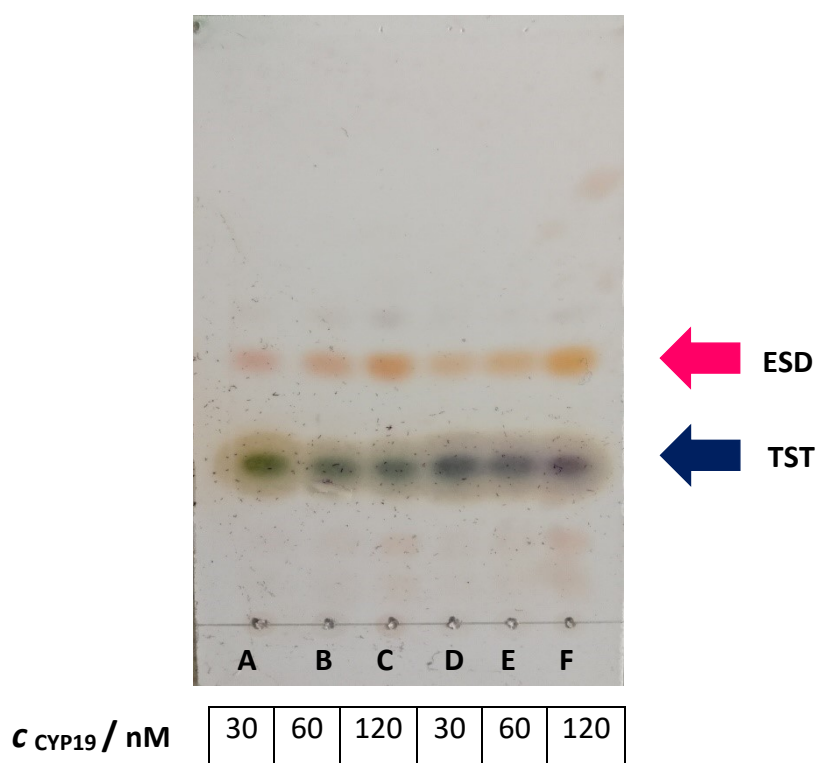
Vzhledem k tomu, že po přidání některých parfémů do reakční směsi se zóny parfému překrývaly se zónami hormonů, byl pro lepší separaci obou hormonů od těchto zón na TLC desce zkoumán vliv pH na vyvíjení chromatogramu. Chromatografické vyvíjení probíhalo v chromatografické vaně za různých pH (Obr. 18). Pomocí stříkačky byly do mobilní fáze chromatografie napouštěné páry NH_3 při vyvíjení první desky a páry HCl při vyvíjení druhé desky. Chromatografické vyvíjení třetí desky probíhalo za neutrálního pH. Parfémy v reakční směsi byly ředěné 10x v MeOH (4 $\mu\text{l}/\text{ml}$ v celkovém objemu 20 μl). Na každé TLC desce byly použity tři různé parfémy a to ChanelTM N°5, LancômeTM La Vie Est Belle a BvlgariTM Goldea The Roman Night.



pH	alkalické	kyselé	neutrální
----	-----------	--------	-----------

Obr. 18: Optimalizace pH vyvíjecí soustavy. Deska číslo 1 je vyvinuta za alkalického pH (NH_3), deska číslo 2 za kyselého pH (HCl) a deska číslo 3 za neutrálního pH. Na drahách A, E, I je standard, tedy po 10 μl TST a ESD. Na drahách B, F, J je parfém ChanelTM N°5; na C, G, L je parfém LancômeTM La Vie Est Belle a na drahách D, H, L parfém BvlgariTM Goldea The Roman Night. Koncentrace aromatasy v reakční směsi je 30 μM .

Posledním parametrem, který byl ještě optimalizován, byla koncentrace enzymu aromatasy. Proto bylo zkoumáno použití aromatasy v koncentracích 30, 60 a 120 nM (Obr. 19). V tomto experimentu byly rovněž srovnávány intenzity zón v oblasti kolem ESD při použití jedenkrát a opakovaně rozmraženého vzorku aromatasy.

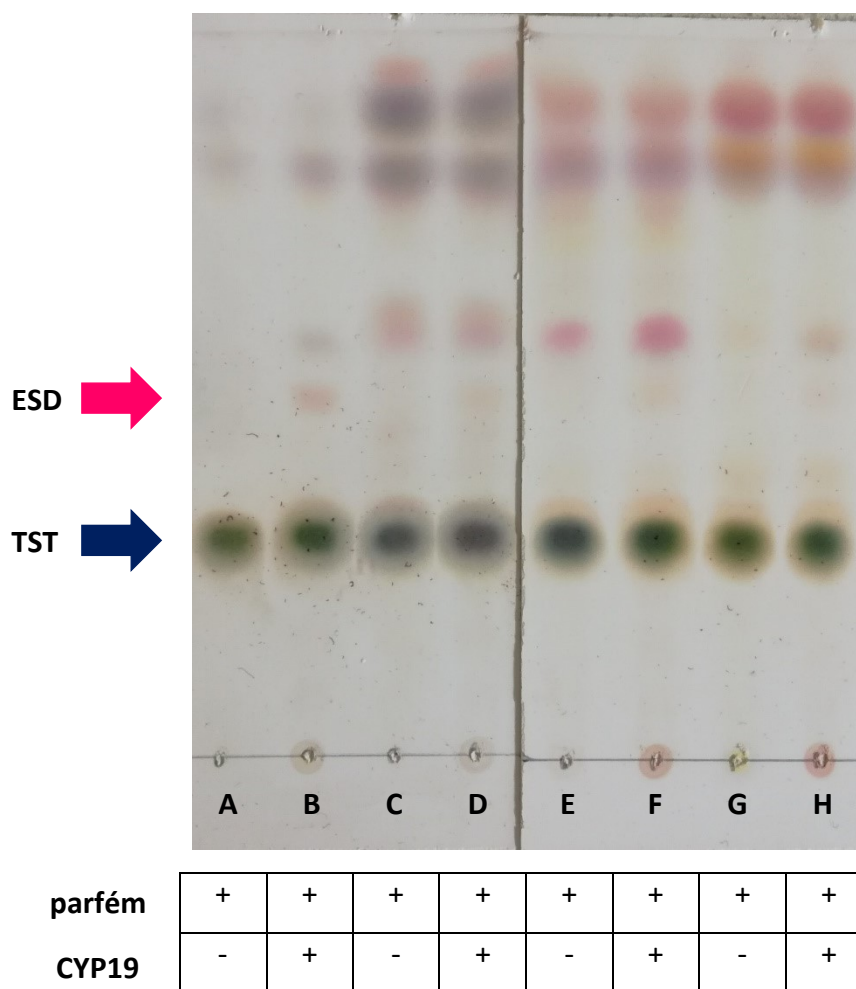


Obr. 19: Optimalizace koncentrace aromatasy. Koncentrace rekombinantního CYP19 v 500 μl reakční směsi: A, D: 30 nM; B, E: 60 nM; C, F: 120 nM. A, B, C: aromatasa, která byla opakovaně rozmražená. D, E, F: aromatasa jedenkrát rozmražená.

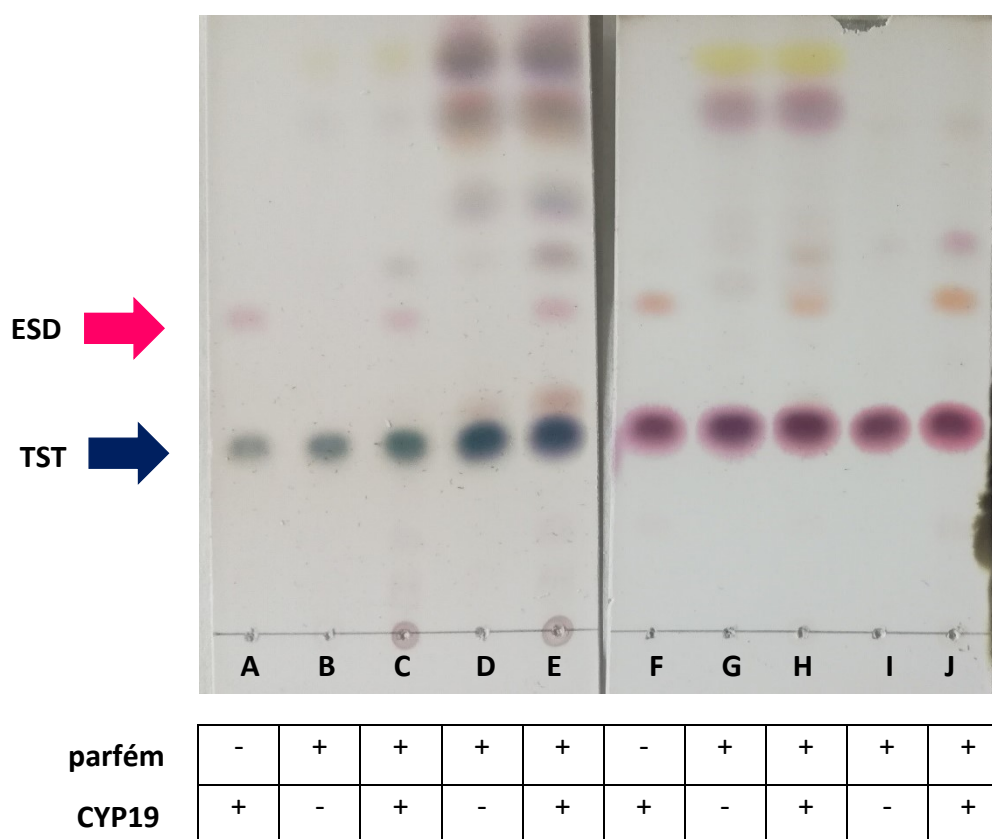
5.3 Sledování vlivu parfémů na aktivitu aromatasy

Testování parfémů:

Pro testování ovlivnění aktivity aromatasy bylo vybráno osm komerčních parfémů celosvětově známých značek. Všechny zkoumané parfémy s výjimkou jednoho, Hugo BossTM Bottled (pánský), jsou dámské: Miss DiorTM Blooming Bouquet, DiorTM J'Adore, BvlgariTM Goldea The Roman Night, ChloéTM Love Story, LancômeTM La Vie Est Belle, VersaceTM Bright Crystal a ChanelTM N°5. Parfémy byly vždy inkubovány v reakční směsi v přítomnosti a bez přítomnosti aromatasy (Obr. 20, str. 38; Obr. 21, str. 39).



Obr. 20: Vliv vybraných parfémů na aktivitu aromatasy. Parfémy obsažené v jednotlivých drahách: A, B: Miss DiorTM Blooming Bouquet; C, D: DiorTM J'Adore; E, F: BvlgariTM Goldea The Roman Night; G, H: ChloéTM Love Story. Koncentrace aromatasy v reakční směsi je v případě drah označených „+“ 30 nM.

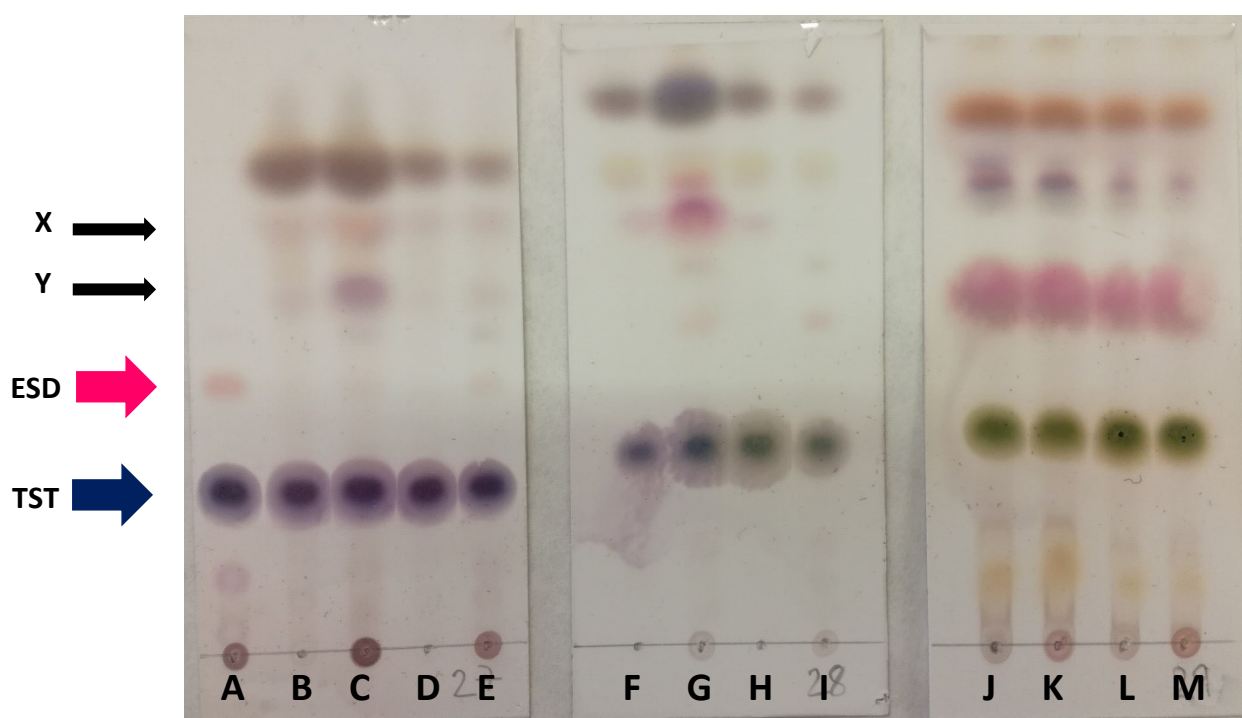


Obr. 21: Vliv vybraných parfémů na aktivitu aromatasy. Dráhy A a F jsou standardy bez parfému. Parfémy obsažené v jednotlivých drahách: B, C: Hugo Boss™ Bottled; D, E: Lancôme™ La Vie Est Belle; G, H: Versace™ Bright Crystal; I, J: Chanel™ N°5. Koncentrace aromatasy v reakční směsi je v případě drah označených „+“ 30 nM.

Z obrázků 20 a 21 je patrné, že ve všech vzorcích, kde byla v reakční směsi přítomna vedle parfému též aromatasa, došlo k tvorbě produktu aromatizační reakce, estradiolu.

Testování průmyslových vůní:

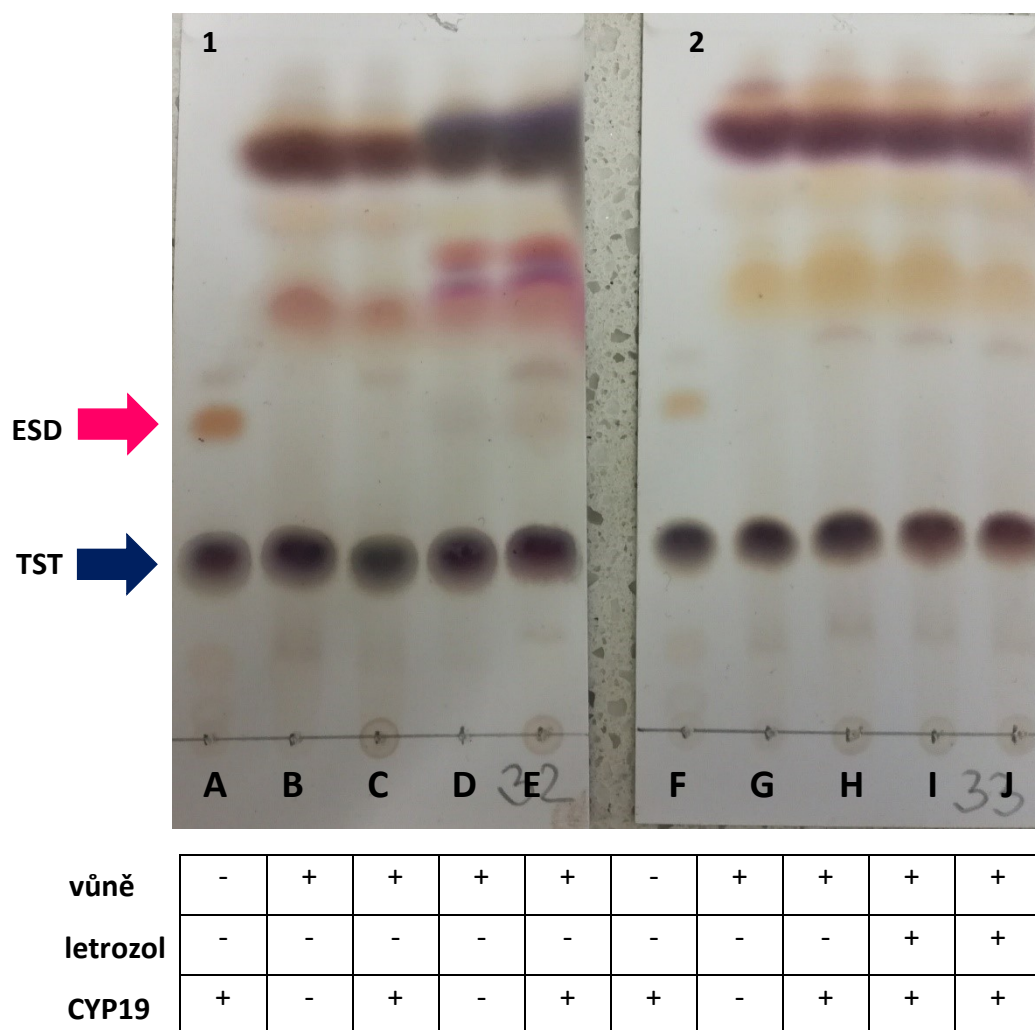
Po testování komerčních parfémů bylo zkoumáno ovlivnění aktivity aromatasy přidáním průmyslových vůní, konkrétně třech osvěžovačů vzduchu do aut poskytnutých firmou JEES s.r.o. V první dráze (Obr. 22, dráha A) se nachází extrakt standardní reakční směsi bez přidané vůně (obsahující TST, CYP19 a pufr). Stejný vzorek vůně je obsažený ve čtyřech drahách vedle sebe, vždy ve dvou koncentracích, s přítomností a bez přítomnosti aromatasy.



vůně	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
c / μl/ml	-	4	4	1,6	1,6	4	4	1,6	1,6	4	4	1,6	1,6
CYP19	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

Obr. 22: Vliv osvěžovačů vzduchu do aut na aktivitu aromatasy. Koncentrace aromatasy v reakční směsi je 120 nM. A je reakční směs bez přidané vůně. Průmyslové vůně obsažené v reakčních směsích: B, C, D, E: Parfém 1; F, G, H, I: Parfém 2; J, K, L, M: Parfém 3.

Z Obr. 22 (str. 40) je zřejmé, že vzorek Parfému 1, zejména ve vyšší koncentraci (dráha C), významně brání tvorbě estradiolu. V přítomnosti Parfému 2 (dráhy G a I) je produkce estradiolu jen slabě patrná bez koncentrační závislosti. Vliv Parfemu 3 nelze vyhodnotit kvůli komigraci některé z jeho složek spolu s estradiolem. Vzhledem k tomu, že se po přidání Parfému 1 a Parfému 2 v přítomnosti aromatasy objevují nové skvrny (označené X, Y na Obr. 22, str. 40) jako možné produkty metabolické aktivity aromatasy, byly oba osvěžovače vzduchu testovány spolu se specifickým inhibitorem aromatasy, letrozolem (Obr. 23). Na desce číslo 2 byl zkoumán Parfém 1 v přítomnosti letrozolu o různých koncentracích (50- 250 μ M), aby bylo možné určit, zda vznik produktů X a Y závisí na aktivitě aromatasy. Koncentrace letrozolu byly zvoleny v takovém rozmezí tak, aby došlo k výrazné inhibici aktivity aromatasy.



Obr. 23: Ověření inhibičního účinku vůní. Koncentrace aromatasy v reakční směsi je 120 nM. A, F jsou standardní reakční směsi bez přidané vůně. Průmyslové vůně obsažené v inkubačních směsích: B, C, G, H, I, J: Parfém 1; D, E: Parfém 2. Dráha I obsahuje inkubační směs s 50 μ M letrozolem a dráha J s 250 μ M letrozolem.

Dle rozložení skvrn na Obr. 23 (str. 41) se podařilo reprodukovat předchozí výsledek, který naznačuje inhibici tvorby ESD oběma parfémy (viz Obr. 22, str. 40). Zóny viditelné v přítomnosti aromatasy na Obr. 22 (str. 40) označené X a Y se již nepodařilo zaznamenat. Nebylo tedy možno prokázat vliv letrozolu na jejich produkci (porovnání zón v drahách G, H, I, J).

6 Diskuze

Problematika látek způsobujících endokrinní dysfunkci je stále aktuálnější, protože každodenní expozice lidské populace těmto látkám má rostoucí trend. Aromatasa, CYP19, je klíčový enzym, jehož inhibice vede k sníženým koncentracím estrogenů a může tím způsobovat nepříznivé účinky na reprodukci, zvýšení kardiovaskulárních příhod, návaly horka, sucho v pochvě, ztrátu libida, únavu, artralgie, ztuhlost kloubů či ztrátu minerální hustoty kostí s následným zvýšeným rizikem zlomeniny [45]. Parfémy jsou hydrofobní povahy, takže po jejich aplikaci na pokožku snadno proniknou do tukové tkáně, kde mohou aktivitu aromatasu ovlivnit. Proto se předkládaná bakalářská práce zaměřuje na studium aromatasu s cílem sledování modulační aktivity parfémů a průmyslovými vůněmi.

Parfémy mohou být potenciálními látkami způsobujícími endokrinní dysfunkci i přes testování obsažených chemických látek, které zabezpečuje ECVAM [46]. Je tedy možná modulační funkce endokrinního systému, následkem čehož mohou vznikat zdravotní problémy a reprodukční poruchy. Problémem testování alternativními metodami při *in vitro* testech je krátká doba expozice, při níž je možné odhalit pouze akutní a nikoli subakutní či chronickou toxicitu. Chemické sloučeniny, které jsou komponentami parfémů a kosmetiky, se zkoumají samostatně, ale nejsou testovány možné interakce mezi více přítomnými složkami, které jsou obsaženy v těchto přípravcích.

Metodou TLC je možné přímo zkoumat, jak ovlivňují parfémů a průmyslové vůně, tedy komplexní směsi jejich komponent, důležitý lidský enzym, aromatasu. Na TLC desce se ve zvolené mobilní fázi TST pohybuje pomaleji než ESD a oba steroidy je možno též dobře rozlišit na základě různého zbarvení po vyvolání chromatogramu kyselinou sírovou (Obr. 15, str. 33). Za optimální inkubační dobu byl zvolen čas 40 minut, protože za tento čas došlo k vytvoření dostatečného množství produktu, ESD, pro jeho detekci na TLC desce (Obr. 16., str. 34). Při srovnání NADPH a NADPH-generujícího systému jako zdroje redukčních ekvivalentů pro aromatizační reakci nebyly zjištěny významné rozdíly, proto byl v experimentech používán samotný kofaktor NADPH (Obr. 17, str. 35). Dále byl hodnocen vliv pH na separaci složek reakční směsi v přítomnosti parfémů. Při změně pH do kyselé oblasti

během vyvíjení chromatogramu (použity páry chlorovodíku) nedošlo k ovlivnění migrace jednotlivých složek reakční směsi oproti provedení v neutrálním pH. Naopak zásadité pH (použity páry amoniaku) vyvíjení chromatogramu ovlivnilo tak, že skvrny látek mezi TST a ESD byly lépe rozlišitelné. Ovšem látky, které se objevovaly nad ESD byly při zásaditém pH hůře rozlišitelné a z toho důvodu bylo pro další experimenty používáno neutrální pH (Obr. 18, str. 36). Jako optimální koncentrace aromatasy byla zvolena 120 nM, protože při této koncentraci byla zóna produktu, ESD, nejvýraznější, což bylo výhodné při následujících testech s parfémů (Obr. 19, str. 37).

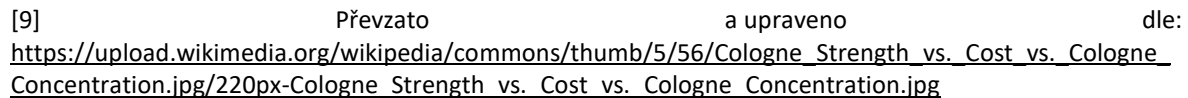
Bylo zkoumáno osm značkových parfémů: Miss Dior™ Blooming Bouquet, Dior™ J'Adore, Bulgari™ Goldene The Roman Night, Chloé™ Love Story, Hugo Boss™ Bottled, Lancôme™ La Vie Est Belle, Versace™ Bright Crystal a Chanel™ N°5. V drahách, kde byla přidávána aromata, je vidět zónu v oblasti ESD srovnatelně výraznou jako v dráze reakční směsi neovlivněné parfémů (Obr. 20, str. 38; Obr. 21, str. 39). U testovaných značkových parfémů nebyla tedy zjištěna inhibice aromatasy, takže tyto výrobky zřejmě neobsahují hormonálně aktivní látky, které by působily v posledním kroku biosyntézy estrogenů.

Při experimentech, ve kterých se testoval vliv průmyslových vůní (osvěžovačů do aut) na aktivitu aromatasy, bylo zjištěno, že tyto vůně by mohly aromatasu *in vivo* skutečně inhibovat a způsobovat tedy endokrinní dysfunkci. Ukázalo se, že vzorky vůní označené jako Parfém 1 a Parfém 2 ovlivňují aktivitu aromatasy, protože po jejich přidavku do reakční směsi se významně snížila intenzita zóny v oblasti produktu, ESD. Inhibici aromatasy je možno vysvětlit tak, že enzym reaguje s nějakou z komponent parfému a vzniká tak nová látka (Obr. 22, str. 40). Vedle tohoto mechanismu kompetitivní inhibice může docházet k inhibici nekompetitivní nebo ireverzibilnímu poškození enzymu. Tyto interakce s aromatasou by mohly tedy způsobovat některé složky, které jsou obsaženy jak v Parfému 1, tak v Parfému 2: 2-(4-terc-butylbenzyl)propionaldehyd; 2,4- dimethylcyklohex-3-en-1- karbaldehyd; 2,6-dimethylokt-7-en-2-ol; 2- methylundecanal; 2-fenylethanol; aldehyd alfa-hexylcinamové kyseliny; benzylacetát; benzylsalicylát; citronello; terpineol či terpineolacetát. Všechny tyto látky zatím nebyly samostatně testovány na inhibici aromatasy.

7 Souhrn

- Jako optimální inkubační doba reakční směsi byla zvolena doba 40 minut
- NADPH a NADPH-generující systém byly stejně efektivní donory redukčních ekvivalentů pro aromatizační reakci
- Nejvhodnější koncentrace aromatasy ze zkoumaných byla koncentrace 120 nM
- Nejúčinnější separace hormonů a vonných komponent na TLC byla při neutrálním pH
- Zkoumané parfémy neměly negativní vliv na aktivitu aromatasy
- Průmyslové vůně, Parfém 1 a Parfém 2, aktivitu aromatasy snižovaly – zřejmě obsahují komponenty, které jsou potenciálními inhibitory tohoto enzymu

8 Literatura

- [1] Borowska, S., Malgorzata M. B. Metals in cosmetics: implications for human health. *Journal of Applied Toxicology* **35**(6), 551-572 (2015)
- [2] Ullah H., Noreen S., Fozia, Rehman A., Waseem A., Zubair S., Adnan M., Ahmad I. Comparative study of heavy metals content in cosmetic products of different countries marketed in Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Arabian Journal of Chemistry* **10**(1), 10-18 (2017)
- [3] Flasiński M., Kowal S., Broniatowski M., Wydro P. Influence of Parabens on Bacteria and Fungi Cellular Membranes: Studies in Model Two-Dimensional Lipid Systems. *The Journal of Physical Chemistry B*. **122**(8), 2332-2340 (2018)
- [4] Elmore A.R., Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Final Report on the Safety Assessment of Aluminum Silicate, Calcium Silicate, Magnesium Aluminum Silicate, Magnesium Silicate, Magnesium Trisilicate, Sodium Magnesium Silicate, Zirconium Silicate, Attapulgit, Bentonite, Fuller's Earth, Hectorite, Kaolin, Lithium Magnesium Silicate, Lithium Magnesium Sodium Silicate, Montmorillonite, Pyrophyllite, and Zeolite. *International Journal of Toxicology* **22**(1), 37-102 (2003)
- [5] Australian Academy of Science, 2018-11-20 [online]. Canberra, Australia. [cit 2019-05-25]. Dostupné z: <https://www.science.org.au/curious/people-medicine/chemistry-cosmetics>
- [6] Pehle, T., Jonas, S.: Parfém. Rebo, Čestlice (2009)
- [7] Schreiner L., Bauber P., Buettner A. Resolving the smell of wood - identification of odour-active compounds in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Scientific Reports* **8** (2018)
- [8] McGill Office for Science and Society. 2009 [online]. Montreal, Canada. [cit. 2019-05-26]. Dostupné z: <https://www.mcgill.ca/oss/article/history/story-perfume>
- [9]  Převzato a upraveno dle: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/56/Cologne_Strength_vs._Cost_vs._Cologne_Concentration.jpg/220px-Cologne_Strength_vs._Cost_vs._Cologne_Concentration.jpg
- [10] Sturm W., Mansfeld G. Tenacity and fixing of aromatic chemicals. *Perfumer and Flavorist* **1**, 6-16 (1976)
- [11] Kumar P., Caradonna-Graham V.M., Gupta S., Cai X., Rao P.N., Thompson J.. Inhalation challenge effects of perfume scent strips in patients with asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **75**(5), 429-433 (1995)
- [12] Berenbaum M.R., Zangerl A.R., Nitao J.K. Furanocoumarins in Wild Parsnip: Effects of Photosynthetically Active Radiation, Ultraviolet Light, and Nutrients. *Ecology* **68**(3), 516-520 (1987)
- [13] De Groot, A.C., Frosch, P.J.. Adverse reactions to fragrances. *Contact Dermatitis* **36**(2), 57-86 (1997)
- [14] Wöhrle, S., Hemmer, W., Focke, M., Götz, M., Jarisch, R. The significance of fragrance mix, balsam of Peru, colophony and propolis as screening tools in the detection of fragrance allergy. *British Journal of Dermatology* **145**, 268-273 (2001)
- [15] Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) - Public Health - European Commission. 2018-02-19 [online]. [cit. 2019-05-25]. Dostupné z: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety_sk

-
- [16] European Commission. Opinion of the scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers. 2004-05-25 [online]. [cit. 2019-05-25]. Dostupné z: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sccp/documents/out280_en.pdf
- [17] Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Union, L 342/59. 2009-12-22 [online]. [cit. 2019-05-25]. Dostupné z: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine_disruptors/docs/cosmetic_1223_2009_regulation_en.pdf
- [18] Madsen, T., Boyd, H.B., Nylén D., Pedersen, A.R., Petersen, G.I., Simonsen, F. Environmental and Health Assessment of Substances in Household Detergents and Cosmetic Detergent Products. Cetox. Environmental Project No. 615 (2001)
- [19] Behan, J.M., Birch, R.A.. Insect repellents. United States Patent. (2003-12-09)
- [20] U.S. Food & Drug Administration, 2018-02-27 [online]. Washington, D.C., United States of America. [cit. 2019-05-19]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetics-science-research/product-testing-cosmetics>
- [21] Scientific Committee on Consumer Safety. [2019-05-10] Allergy Alert Test (AAT) as a proof-of-concept study. https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/opinions_en
- [22] Cosmetic Ingredient Review. 2016 [online]. [cit. 2019-05-24] Dostupné z: <https://www.cir-safety.org/>
- [23] U.S. Food & Drug Administration, 2017-03-11 [online]. Prohibited & Restricted Ingredients in Cosmetics. Washington, D.C., United States of America. [cit. 2019-05-19]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetics-laws-regulations/prohibited-restricted-ingredients-cosmetics#prohibited>
- [24] List of substances prohibited in cosmetic products. 2019-07-06 [online]. [cit. 2019-05-23]. Dostupné z: http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/pdf/COSING_Annex%20II_v2.pdf
- [25] van Meeuwen, J.A., van Son, O., Piersma, A.H., de Jong, P.C., van den Berg, M. Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics. *Toxicology and Applied Pharmacology* **230**(3), 372-382 (2008)
- [26] U.S. Food & Drug Administration, 2017-11-22 [online]. Washington, D.C., United States of America. [cit. 2019-05-19]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/cosmetics/product-testing-cosmetics/animal-testing-cosmetics>
- [27] OECD. *Test No. 2011: Guidance document for describing non-guidance in vitro test methods*, 2014- 12- 15. [online]. [cit.2019-05-26] Dostupné z: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2014\)35&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2014)35&doclanguage=en)
- [28] AltTox, 2019 [online]. [cit. 2019-05-26] Dostupné z: <http://alttox.org/>
- [29] Mannerström, M., Toimela, T., Sarkanen, J.R., Heinonen, T. Human BJ Fibroblasts is an Alternative to Mouse BALB/c 3T3 Cells in In Vitro Neutral Red Uptake Assay. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **121**, 109-115 (2017)
- [30] OECD (2018), *Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. Dostupné z: <https://doi.org/10.1787/9789264070707-en>. [cit. 2019-05-25].

-
- [31] OECD (1981), *Test No. 411: Subchronic Dermal Toxicity: 90-day Study*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. Dostupné z: <https://doi.org/10.1787/9789264070769-en> [cit. 2019-05-25].
- [32] Sasaki, K., Umeda M., Sakai, A., Yamazaki, S., Tanaka, N. Transformation Assay in Bhas 42 Cells: A Model Using Initiated Cells to Study Mechanisms of Carcinogenesis and Predict Carcinogenic Potential of Chemicals. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* **33**(1), 1-35 (2015)
- [33] OECD (2004), *Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. Dostupné z: <https://doi.org/10.1787/9789264071162-en>. [cit. 2019-05-26].
- [34] Netzlaff, F., Lehr, C.M., Wertz, P.W., Schaefer, U.F. The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **60**(2), 167-178 (2005)
- [35] Fentern, J. H. Validation of in vitro Tests for Skin Corrosivity, *ALTEX* **16**(3), 150-153 (1999)
- [36] Abud, A.P.R., Kuligovski, C., Corrêa, Moraes, E.C.P., Caruso, R.R.B., Schuck, D.C., Brohem, C.A., Dallagiovanna, B., Aguiar, A.M. The inhibition of adipogenesis via an in vitro assay can reduce animal use by more precisely estimating the starting dose for the acute toxic class method. *Toxicology Letters* **311**, 80-90 (2019)
- [37] Di Sotto, A., Mazzanti, G., Carbone, F., Hrelia, P., Maffei, F. Genotoxicity of lavender oil, linalyl acetate, and linalool on human lymphocytes in vitro. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **52**,1 69-71 (2011)
- [38] Fail, P. A., Sloan, C. S., Johnson, J. D., Brown, V. J. Draft Detailed Review Paper on Steroidogenesis Screening Assays and Endocrine Disruptors, Columbus: *Battelle* (2002). Dostupné z: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/33689020.pdf>. [cit. 2019-08-10]
- [39] Trojan, S.: *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada (2003)
- [40] Sanderson, J. T. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences* **94**,1 3-21. (2006). [cit. 2019-05-34]. <https://academic.oup.com/toxsci/article/94/1/3/1711609>
- [41] Sanderson, T., van den Berg, M. Interactions of xenobiotics with the steroid hormone biosynthesis pathway. *Pure and Applied Chemistry* **75**,11-12 (2003)
- [42] Matouš, B., et al.: *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vydání. Praha : Galén (2010)
- [43] Převezato z: <http://www.rcsb.org/structure/4KQ8>
- [44] Furr, B.J.A. *Aromatase inhibitors*. Boston: Birkhäuser (2006)
- [45] Fabian, C.J. The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer. *International Journal of Clinical Practice* **61**,12 2051-2063 (2007)
- [46] Alternatives to animal testing and safety assessment of chemicals. 2017-02-10 [online]. [cit. 2019- 07- 05]. Dostupné z: <https://ec.europa.eu/jrc/en/research-topic/alternatives-animal-testing-and-safety-assessment-chemicals>